

## 学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 6 2 9 号	学位授与年月日	平成 2 4 年 3 月 1 9 日
氏 名	Sharkar Mohammad Tofael Kabir		
論文題目	Isl1-specific knockout of Sonic hedgehog results in craniofacial and cardiac defects (Isl1 遺伝子発現領域特異的に Sonic hedgehog 遺伝子をノックアウトすると、頭蓋顔面と心臓の異常を引き起こす)		

博士(医学)      Sharkar Mohammad Tofael Kabir

## 論文題目

*Isl1*-specific knockout of *Sonic hedgehog* results in craniofacial and cardiac defects

( *Isl1* 遺伝子発現領域特異的に *Sonic hedgehog* 遺伝子をノックアウトすると、頭蓋顔面と心臓の異常を引き起こす )

## 論文の内容の要旨

### [ はじめに ]

哺乳動物の初期発生で、第一鰓弓の下顎成分 (MdPA1) は両側のふくらみとして形成される。それぞれの鰓弓はいろいろな組織系譜細胞からなる。各鰓弓の外胚葉は外表に並び、一方内胚葉は前腸と連続している。下顎突起の間質は頭部神経堤細胞と傍軸中胚葉細胞に由来する。哺乳動物での MdPA1 の時間-空間的遺伝子発現パターンは歯、下顎骨格筋、側頭骨壁、中耳骨や舌、軟部組織などの鰓弓由来組織の形成に必須である。胎生 9.5 日では、頭部の両側におこる伸展により下顎弓と上顎弓の原基が形成され、腹側へと成長する。次に、下顎弓、上顎弓、前鼻突起の融合により顔面の基本的な形が決定される。この複雑な形態形成過程の障害により頭蓋顔面奇形がおこる。これは、ヒトの最も頻繁におこる奇形である。130 以上のヒト症候群は第一鰓弓の誤った発生によりおこるようである。

*Sonic hedgehog* (Shh) は左右の決定、神経管の背腹の決定、内胚葉の発生、上下肢の前後決定、脳の発生などの多様な発生過程で決定的な役割を果たす。Shh シグナルは頭蓋顔面の発生に必須である。ヒトで SHH 遺伝子に突然変異がおこると完全前脳症となり、Shh ノックアウトマウスでは重度の頭蓋異常を呈する。

申請者は、*Isl1* (*Isl1*) 遺伝子発現領域特異的に Shh 遺伝子をノックアウトして、Shh 遺伝子の発生過程での新規な役割を見出すことを目的に、conditional Shh knockout (*Shh<sup>c/c</sup>*) マウス *Isl1* (Cre knock-in) (*Isl1*-Cre KI) マウスを交配して第一鰓弓由来組織での異常を観察した。

### [ 材料ならびに方法 ]

*Shh<sup>c/c</sup>* マウスは Jackson Laboratory から購入した。*Isl1*-Cre KI マウスは UCSD の Sylvia Evans 博士から譲受した。ROSAR26R mouse は Soriano 博士から譲受した。組織学的解析、骨軟骨標本の作製、lacZ 染色、whole-mount in situ hybridization、section in situ hybridization は通常の方法に従った。胎生 10.5 日の鰓弓動脈の可視化は心室へのインクの注射を行い、固定して、組織を透明化した。

### [ 結果 ]

まず、*Isl1*-Cre マウスと ROSAR26R マウスを交配で得られる胎仔 (胎生 10.5 日) での *Isl1* 遺伝子の発現を確認した。後肢、心臓、上顎の他に表面外胚葉、特に第一鰓弓で強い発現を見出した。Whole-mount in situ hybridization 法でも、*Isl1* の発現は上顎、前鼻突起、第一鰓溝に認められた。一方、鰓弓レベルでは、Shh は神経床、脊索、内胚葉、外胚葉に発現して

いるが、Isl1-Cre により Shh を欠失させたところ、神経床、脊索は変化がなかったが、内胚葉および外胚葉の Shh 発現が消失していた。

Isl1-Cre;Shh<sup>c/c</sup> マウス胎仔の鰓弓由来組織の症状は、下顎の欠損、上顎の形成異常、頭蓋骨の異常、耳小骨の欠損、口蓋形成異常などが観察された。前肢は正常で、後肢の欠失は Isl1 が後肢のみに発現しているためである。また、心臓では、第 6 鰓弓動脈異常による大動脈幹遺存が認められた。

こういう組織形成異常がおこる分子メカニズムを第一鰓弓に注目して行った。異常をおこした組織は神経堤に由来するものが多いので、まず神経堤マーカーである Snail と Pax3 の発現を観察した。野生型胎仔では第一鰓弓は Snail1, Pax3 とともに発現しているが、ノックアウトマウスの第一鰓弓では発現がほとんどなかった。また、神経堤細胞に発現する Ednra 遺伝子およびその下流の Dlx5, Dlx6, dHAND, eHAND 遺伝子の発現も変化していた。

次に、発生途上の細胞が増殖する際に重要な役割をする Fgf4, Fgf8, Fgf10 と Fgf8 の下流で働く Ptx1 の胎仔での発現を観察した。結果は、野生型では第一鰓弓の口部外胚葉に発現する Fgf8 が消失し、鰓弓間質で発現する Ptx1 も著減していた。また、鰓弓内胚葉で発現する Fgf8、間質で発現する Fgf8 も消失していた。そして、下顎で発現する Bmp4 および下流の Msx1, Msx2 の発現は消失していた。そして、内胚葉から分泌される Shh により間質で誘導される Foxc2, Tbx1 の発現も消失していた。第二鰓弓マーカーである Hoxa2 は余り影響を受けていなかった。

#### [ 考察 ]

第一鰓弓に神経堤マーカーが陰性であり、Ednra およびその下流の遺伝子発現が異常なことから、神経堤細胞が第一鰓弓に到着していないと思われる。本研究と過去の知見を総合的に考慮すると、以下のような分子メカニズムが考えられる。鰓弓内胚葉から分泌される Shh は間質でまず Foxc2 を活性化し、それが同じ細胞内で Tbx1 を誘導する。活性化した Tbx1 は Fgf10 を活性化して間質細胞は Fgf10 を分泌する。また、Tbx1 により活性化する未知分泌蛋白が鰓弓外胚葉に作用し、外胚葉は Fgf8 を分泌する。また、第一鰓弓由来組織から分泌される Bmp4 は上顎と下顎の間質に作用し、口蓋構造や歯を形成する。第 1 鰓弓間質に移動した Ednra を細胞表面にもつ神経堤細胞ではエンドセリンシグナルにより Dlx5/6 が誘導され、その下流の dHAND, eHAND が部位特異的に誘導され下顎構造が誘導される。これらの分子が欠損したノックアウトマウスでは上述した症状がひきおこされたと理解できる。

#### [ 結論 ]

1. Isl1 発現部位特異的に Shh を欠失させたマウスは口蓋顔面、心臓、下肢の異常を示した。
2. 鰓弓内胚葉から分泌される Shh により頭蓋顔面構造が形成されることが示唆された。
3. 神経堤細胞と間質細胞の両方が神経堤由来組織の形成に関わっていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

Sonic hedgehog (Shh) は、頭蓋顔面領域を含む哺乳類胎児発生過程で決定的な役割を果たしている。事実、Shh ノックアウトマウスは重度の頭蓋異常を呈し、ヒト SHH ヘテロ接合性患者は全前脳胞症を含む種々の頭蓋顔面異常を有する。しかし、Shh の頭蓋顔面形成における役割の詳細は、Shh ノックアウトマウスが多様かつ重度な症状により致死的であるため、未だ明確とはなっていない。

申請者らは、第一鰓弓や、後肢、心臓、上顎、表面外胚葉などの *Isl1* (*Isl1*) 遺伝子発現領域特異的に Shh 遺伝子をノックアウトし、そのマウスの詳細な解析を行った。Shh の発現は、野生型マウスでは神経床、脊索、内胚葉、外胚葉で検出されたが、*Isl1*-Cre によるノックアウトマウスでは内胚葉および外胚葉で消失していた。*Isl1*-Cre;*Shh*<sup>ec</sup> マウス胎仔は、下顎の欠損、上顎の形成異常、頭蓋骨の異常、耳小骨の欠損、口蓋形成異常などの鰓弓由来組織の頭蓋顔面異常と、第 6 鰓弓動脈異常による大動脈幹遺存を呈した。さらに、ノックアウトマウスの第一鰓弓では神経堤マーカーである *Snail* と *Pax3* の発現がほぼ消失し、神経堤細胞で発現する *Ednra* 遺伝子およびその下流の *Dlx5*, *Dlx6*, *dHAND*, *eHAND* 遺伝子の発現も低下していた。また、第一鰓弓の口部外胚葉における *Fgf8*, *BMP4*, *Edn1* の発現消失、間質における *Foxc2*, *Tbx1*, *Fgf10* の発現消失、下顎における *Bmp4* の下流遺伝子である *Msx1*, *Msx2* の発現消失が認められた。

この変異マウスでは、神経堤細胞が第一鰓弓に到着していないと思われる。そして、過去のデータと総合して、申請者は、内胚葉から分泌される Shh が、(1)直接神経堤細胞に作用する経路、(2)鰓弓間質細胞に働き最終的に *Fgf10* を誘導しこれが外胚葉に作用し、外胚葉から分泌される *Fgf8*, *Bmp4*, *Edn1* が神経堤細胞に作用する経路、の両経路により下顎、上顎等の形成に関わっている事を提唱した。

審査委員会では、コンディショナルノックアウトマウスを作成し、Shh の頭蓋顔面領域発生における役割を解明したことを高く評価した。

以上により、本論は博士(医学)の学位授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	緒方 勤
副査	岩下 寿秀	副査 池上 浩司